

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 9 月 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 6 1 5 2 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 6 1 5 2 4]

REC'D 17 OCT 2003

WIPO PCT

出 願 人 鐘淵化学工業株式会社
Applicant(s):

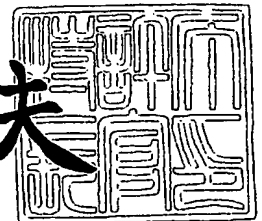
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2 0 0 3 年 1 0 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4862

【提出日】 平成14年 9月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 41/00
C07D233/20
C07C227/30

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会
社高砂工業所内

【氏名】 大石 孝洋

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会
社高砂工業所内

【氏名】 難波 弘憲

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会
社高砂工業所内

【氏名】 菅原 昌信

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会
社高砂工業所内

【氏名】 泉田 将司

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会
社高砂工業所内

【氏名】 本田 達也

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社
高砂工業所内

【氏名】 森 耕平

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社
高砂工業所内

【氏名】 柳澤 恵広

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社
高砂工業所内

【氏名】 井上 健二

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

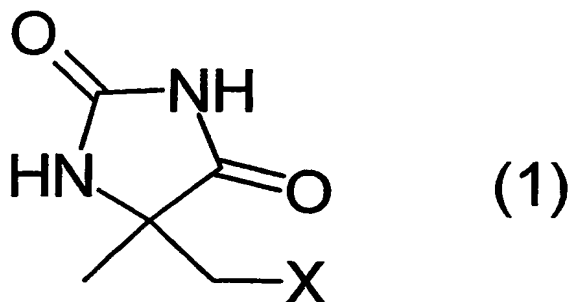
【書類名】 明細書

【発明の名称】 L- α -メチルシステイン誘導体の製造方法

【特許請求の範囲】

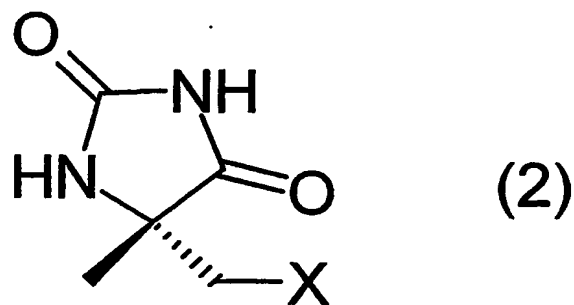
【請求項1】 一般式(1)；

【化1】



(式中、Xはハロゲン原子を表す) で表される5-ハロメチル-5-メチルヒダントインのラセミ体を、ヒダントイナーゼによりD立体選択的に加水分解することを特徴とする、一般式(2)；

【化2】



(式中、Xは前記と同じ) で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの製造方法。

【請求項2】 Xが塩素原子であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項3】 ヒダントイナーゼが、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、バチルス属 (*Bacillus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 又はリゾビウム属 (*Rhizobium*) に属する微生物由来である請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】 ヒダントイナーゼが、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Ag*

obacterium sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、
バチルス・スピーシーズ (Bacillus sp.) KNK245 (FERM
BP-4863)、シュドモナス・プチダ (Pseudomonas pu
tida) IFO12996、シュドモナス・スピーシーズ (Pseudom
onas sp.) KNK003A (FERM BP-3181) 又はリゾビウ
ム・スピーシーズ (Rhizobium sp.) KNK1415 (FERM
BP-4419) 由来である請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項5】 ヒダントイナーゼが、形質転換微生物エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) HB101 pTH104 (FERM BP-4864)、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) HB101 pAH1043 (FERM BP-4865)、又はエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) HB101 pPHD301 (FERM BP-4866) 由来である請求項1又は2に記載の製造方法。

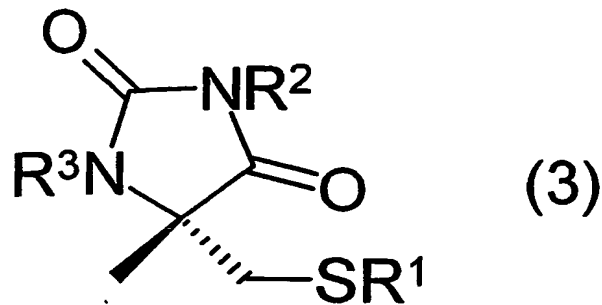
【請求項6】 前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを、酢酸エチル、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、t-ブチルアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、及びアセトニトリルからなる群より選択される少なくとも1種の溶媒を用いて晶析することにより、光学純度を向上させることを特徴とするL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの製造方法。

【請求項7】 貧溶媒として、ベンゼン、トルエン、ヘキサン、ヘプタン、及びシクロヘキサンからなる群から選択される少なくとも1種の溶媒を併用する請求項7記載の製造方法。

【請求項8】 晶析に供するL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインが、請求項1記載の方法で製造されたものである請求項6又は7記載の製造方法。

【請求項9】 前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを硫黄化剤と反応させることを特徴とする、一般式(3)；

【化3】



(式中、 R^1 は水素原子、 $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表し、 R^2 、 R^3 はそれぞれ独立に水素原子もしくは $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表し、互いに同じまたは異なってもよい) で表されるL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインの製造方法。

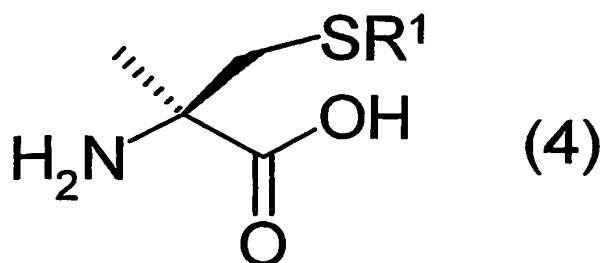
【請求項10】 請求項1から5のいずれかに記載の方法で得られたL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを硫黄化剤と反応させることを特徴とする、請求項9記載のL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインの製造方法。

【請求項11】 硫黄化剤として、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水硫化物、水硫化アンモニウム、アルキルメルカプタン、アラルキルメルカプタン、又はチオ酢酸もしくはそのアルカリ金属塩を用いることを特徴とする請求項9又は10記載の製造方法。

【請求項12】 硫黄化剤として水硫化ナトリウム、水硫化カリウム、チオ酢酸カリウム、t-ブチルメルカプタン、ベンジルメルカプタン、又はp-メトキシベンジルメルカプタンを用いることを特徴とする、請求項9又は10記載の製造方法。

【請求項13】 請求項9から12のいずれかに記載の方法で得られた前記式(3)で表されるL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを酸またはアルカリで加水分解および必要に応じて窒素原子、硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式(4)；

【化 4】



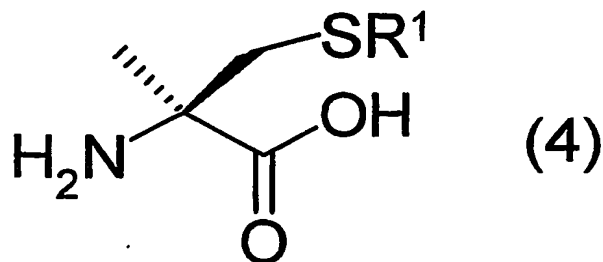
(式中、 R^1 は水素原子、 $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、又は $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表す) で表される L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法。

【請求項 14】塩酸、硫酸、硝酸、臭化水素酸、酢酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群より選択される少なくとも一種の酸を用いて加水分解を行う請求項 13 記載の製造方法。

【請求項 15】水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化バリウム、炭酸ナトリウム、及び炭酸カリウムからなる群より選択される少なくとも一種のアルカリを用いて加水分解を行う請求項 13 記載の製造法。

【請求項 16】前記式 (2) で表される L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインと硫黄化剤をアルカリ水溶液中で反応させ硫黄化と加水分解をワンポットで行い、必要に応じて硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式 (4) ；

【化 5】



(式中、 R^1 は水素原子、 $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していて

も良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表す) で表される L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法。

【請求項 17】 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法で得られた L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを用いることを特徴とする請求項 16 記載の製造方法。

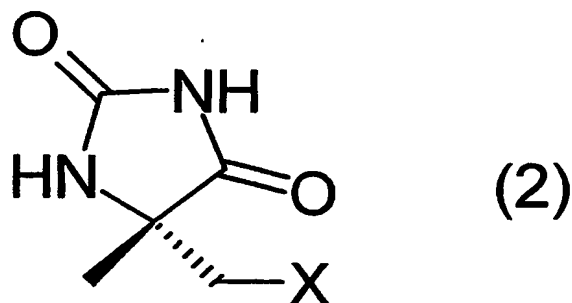
【請求項 18】 前記式 (4) において R^1 が水素原子である L- α -メチルシステインまたはその塩を製造するにあたり、副生したジスルフィド体のジスルフィド結合を還元剤を用いて切断することにより、L- α -メチルシステインまたはその塩に変換することを特徴とする請求項 13 から 16 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 19】 還元剤がトリアルキルホスフィンあるいはトリアリールホスフィンであることを特徴とする請求項 18 記載の製造法。

【請求項 20】 還元剤がトリフェニルホスフィンであることを特徴とする請求項 18 記載の製造法。

【請求項 21】 一般式 (2) ;

【化 6】

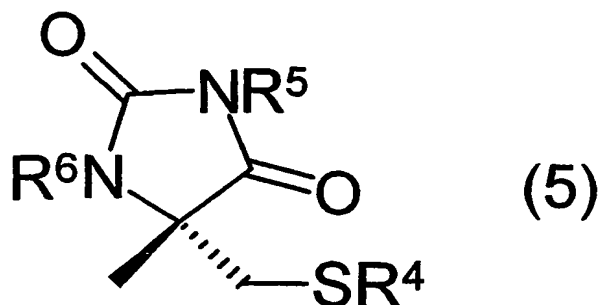


(式中、X はハロゲン原子を表す) で表される L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントイン。

【請求項 22】 X が塩素原子である請求項 21 記載の化合物。

【請求項 23】 一般式 (5) ;

【化7】



(式中、 R^4 は $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または2級、あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基、 R^5 、 R^6 はそれぞれ独立に水素原子もしくは $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異なってもよい)で表されるL-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン。

【請求項24】 R^5 、 R^6 が水素原子、 R^4 がベンジル基もしくはp-メトキシベンジル基である請求項23記載の化合物。

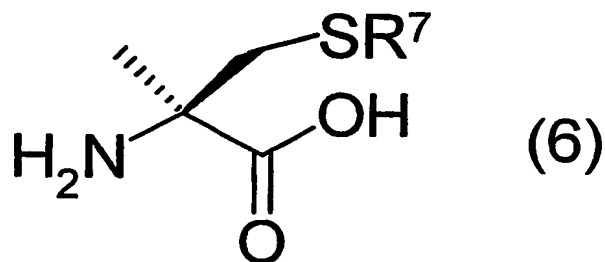
【請求項25】 R^4 、 R^6 がアセチル基、 R^5 が水素原子である請求項22記載の化合物。

【請求項26】 R^4 、 R^5 、 R^6 が全てアセチル基である請求項23記載の化合物

。

【請求項27】一般式(6)；

【化8】



(式中、 R^7 は置換基を有していても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基または $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表す)で示されるL- α -メチルシステイン誘導体又は該化合物と酸との塩。

【請求項 28】 R^7 がベンジル基、p-メトキシベンジル基またはアセチル基である請求項 27 記載の化合物。

【請求項 29】 酸が塩酸、臭化水素酸、硫酸、p-トルエンスルホン酸またはカンファースルホン酸である請求項 27 記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬品中間体として有用な L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法としては、以下の様な方法が知られている。

1) 光学活性システインとピバルアルデヒドより得られる光学活性チアゾリジン化合物への不斉アルキル化による方法（特許文献 1、特許文献 2、および特許文献 3）。

2) 光学活性アラニンとベンズアルデヒドより得られる光学活性チアゾリジン化合物への不斉チオアルキル化による方法（非特許文献 1）。

3) 光学活性バリンとアラニンより合成される光学活性ジケトピペラジン化合物を不斉プロモメチル化し、得られた化合物の臭素原子をアルカリ金属アルキルチオラートで置換する方法（非特許文献 2）。

4) 2-メチル-2-プロペン-1-オールのシャープレス不斉酸化により得られる光学活性な 2-メチルグリシドールから光学活性アジリジン化合物を合成し、これにチオールを反応させる方法（非特許文献 3）。

5) アミノマロン酸誘導体をアルキル化した後に、豚肝臓エステラーゼ（以下 PLE と略す）による非対称化を行い、得られた光学活性エステルをチオ酢酸アルカリ金属塩と反応させる方法（非特許文献 4）。

6) システイン誘導体より合成されるチアゾリン化合物のメチル化により得られるラセミ体のチアゾリン化合物をキラル HPLC にて分離精製する方法（非特許

文献5)。

【0003】

しかしながら、1)、2)、3)のいずれの方法においても、プチルリチウム等の高価な塩基を用いた低温反応が含まれ、特殊な製造設備が必要である。また、4)の方法は工程数が長くて煩雑であり、工業的に不利である。5)の方法ではPLEを用いたジエステルの非対称化を鍵工程としているが、PLEは大量生産が困難であるため工業的規模での安定確保は難しく、実用的とは言い難い。6)の方法ではチアゾリン化合物の不斉アルキル化は知られておらず、ラセミ体のキラルHPLCによる分割が不可欠であるが、不要の鏡像異性体をラセミ化して再利用することができないために生産性が低く、工業規模での製造は有利ではない。以上のように、いずれの方法においても光学活性 α -置換システインまたはその塩の工業的製造方法としては解決すべき課題を有している。

【0004】

一方、ハロアセトンから容易に得られる5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを、ヒダントイナーゼによる立体選択的な加水分解により光学活性なL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインとし、これと硫黄化剤との反応でL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを合成、これを加水分解することでL- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の効率的なプロセスを構築できると考えられるが、ヒダントイナーゼを用いた立体選択的な加水分解による5位に2つの異なった置換基を有する光学活性ヒダントインの効率的な製造方法、および得られたヒダントインを加水分解することによる α 位に2つの異なる置換基を有する光学活性アミノ酸誘導体の製造方法は全く知られていない。

【0005】

【特許文献1】

特表2000-515166号公報

【0006】

【特許文献2】

WO01/72702号パンフレット

【0007】

【特許文献3】

WO01/72703号パンフレット

【0008】

【非特許文献1】

Tetrahedron, 1999年, 55巻, 10685~10694頁

【0009】

【非特許文献2】

J. Org. Chem., 1992年, 57巻, 5568~5573頁

【0010】

【非特許文献3】

J. Org. Chem., 1995年, 60巻, 790~791頁

【0011】

【非特許文献4】

J. Am. Chem. Soc., 1993年, 115巻, 8449~8450
頁

【0012】

【非特許文献5】

Synlett., 1994年, 9巻, 702-704頁

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

上記に鑑み、本発明の目的は、ラセミ体の5-ハロメチル-5-メチルヒダントインのヒダントイナーゼによるD立体選択的加水分解プロセスを利用して、医薬品の中間体として有用なL- α -メチルシステインおよびその塩を安価で入手容易な原料から簡便に製造できる方法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は上記に鑑み、鋭意検討を行った結果、安価に入手可能なハロアセトンより容易に得られる5-ハロメチル-5-メチルヒダントインをヒダントイナーゼによりD立体選択的に加水分解し光学活性なL-5-ハロメチル-5-メ

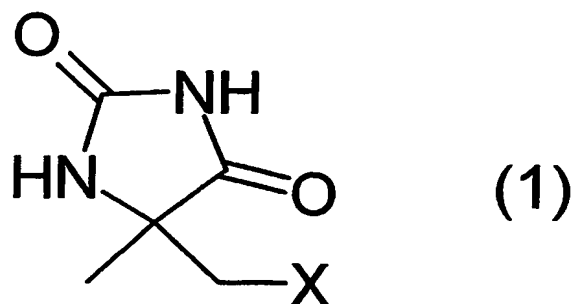
チルヒダントインとし、これと硫黄化剤との反応でL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを合成、これを加水分解することによりL- α -メチルシステイン誘導体またはその塩を得る方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【0015】

すなわち本発明は一般式(1)；

【0016】

【化9】

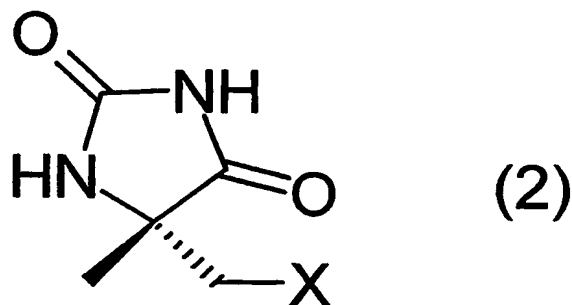


【0017】

(式中、Xはハロゲン原子を表す)で表される5-ハロメチル-5-メチルヒダントインのラセミ体を、ヒダントイナーゼによりD立体選択的に加水分解することを特徴とする、一般式(2)；

【0018】

【化10】



【0019】

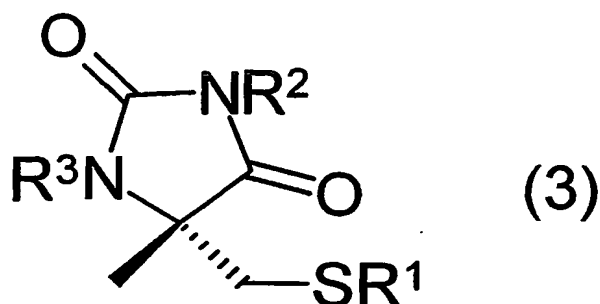
(式中、Xは前記と同じ)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの製造方法に関する。

【0020】

また本発明は、前記式(2)で表される L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを硫黄化剤と反応させることを特徴とする、一般式(3)；

【0021】

【化11】



【0022】

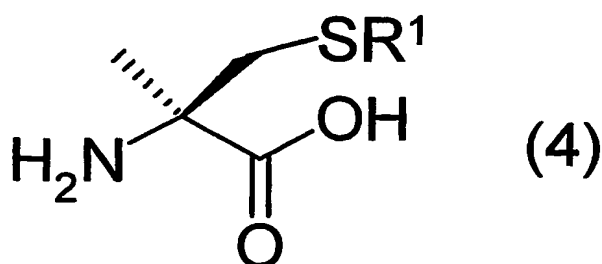
(式中、R¹は水素原子、C₁～C₂₀の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有してもよいベンジル基、C₁～C₂₀のアルカノイル基、又はC₁～C₂₀のアルコキシカルボニル基を表し、R²、R³はそれぞれ独立に水素原子もしくはC₁～C₂₀のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異なってもよい)で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントインの製造方法に関する。

【0023】

さらに本発明は、前記式(3)で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを酸またはアルカリで加水分解し、必要に応じて窒素原子、硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式(4)；

【0024】

【化12】



【0025】

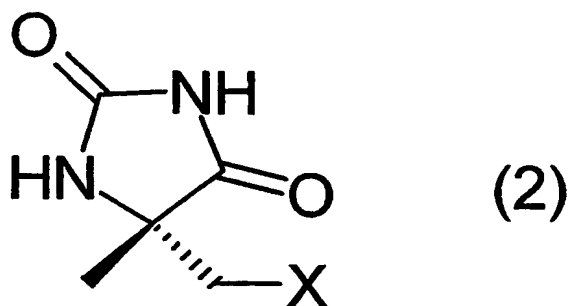
(式中、 R^1 は前記と同じ) で表される L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法に関する。

【0026】

また、本発明は前記式 (2) ;

【0027】

【化13】



【0028】

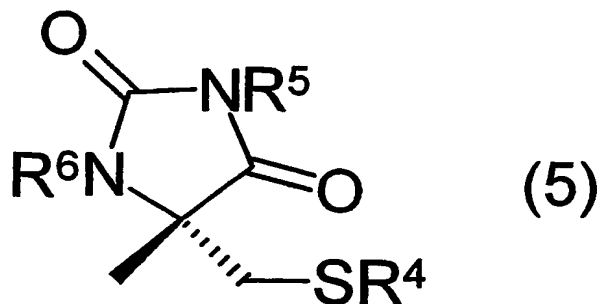
(式中、Xは前記と同じ) で表される L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインである。

【0029】

更に本発明は前記式 (5) ;

【0030】

【化14】



【0031】

(式中、 R^4 は $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または2級、あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有してもよいベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、又

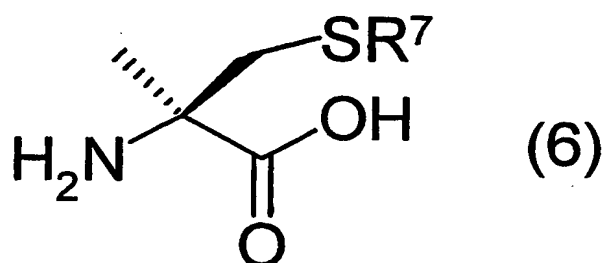
はC₁～C₂₀のアルコキシカルボニル基を表し、R⁵、R⁶はそれぞれ独立に水素原子もしくはC₁～C₂₀のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異なっているてもよい) で表されるL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインでもある。

【0032】

さらに本発明は前記式(6)；

【0033】

【化15】



【0034】

(式中、R⁷は置換基を有していても良いベンジル基、C₁～C₂₀のアルカノイル基、またはC₁～C₂₀のアルコキシカルボニル基を表す) で示されるL-α-メチルシステイン誘導体またはその塩でもある。

【0035】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明では、まず、前記式(1)で表されるラセミ体の5-ハロメチル-5-メチルヒダントインをヒダントイナーゼを用いてD立体選択的に加水分解して、前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを製造する。

【0036】

ラセミ体の5-ハロメチル-5-メチルヒダントイン(1)は、例えばBucherer法により容易に取得できる。すなわち相当するハロケトンにシアン化ナトリウムあるいはシアン化カリウムおよび炭酸アンモニウムと水、エタノール混合溶媒中で攪拌することにより目的とするヒダントインを合成することができ

る。

【0037】

本工程で用いるヒダントイナーゼとは、5-置換ヒダントイン誘導体を加水分解してN-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体を生成する活性を有する酵素である。本発明で用いる立体選択的な加水分解を触媒するヒダントイナーゼとしては、動物、植物、微生物由来のものが使用できるが、工業的な利用には微生物由来のものが好ましい。微生物としては、当該酵素の生産能力を有する微生物であればいずれも利用できるが、例えば、以下の公知の、当該酵素の生産能力を有する微生物を挙げることができる。

【0038】

すなわち、細菌に属するものとしてはアセトバクター属 (*Acetobacter*)、アクロモバクター属 (*Achromobacter*)、アエロバクター属 (*Aerobacter*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、エルウイニア属 (*Erwinia*)、エシエリヒア属 (*Escherichia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、ミクロバクテリウム属 (*Microbacterium*)、ミクロコッカス属 (*Micrococcus*)、プロタミノバクター属 (*Protaminobacter*)、プロテウス属 (*Proteus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、サルチナ属 (*Sartina*)、セラチア属 (*Serratia*)、キサントモナス属 (*Xanthomonas*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*)、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*)、リゾビウム属 (*Rhizobium*) など、放線菌に属するものとしてはアクチノミセス属 (*Actinomyces*)、ミコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes*)、ロドコッカス属 (*Rhodo*

coccus) など、かびに属するものとしてはアスペルギルス属 (*Aspergillus*)、パエシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*) など、酵母に属するものとしてはキャンディダ属 (*Candida*)、ピヒア属 (*Phichia*)、ロードトルラ属 (*Rhodotorula*) 又はトルロプシス属 (*Torulopsis*) などがある。

【0039】

好ましくは、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、バチルス属 (*Bacillus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 又はリゾビウム属 (*Rhizobium*) に属する微生物由来の酵素が挙げられる。

【0040】

さらに好ましくは、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、バチルス・スピーシーズ (*Bacillus* sp.) KNK245 (FERM BP-4863)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IFO12996、シュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.) KNK003A (FERM BP-3181) 又はリゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) KNK1415 (FERM BP-4419) 由来の酵素が挙げられる。

【0041】

なお、本発明中、当該ヒダントイナーゼは酵素自体、或いは本酵素活性を有する微生物若しくはその処理物等、及び本酵素活性を有する形質転換微生物或いはその処理物で用いられ得る。ここで、微生物の処理物とは、例えば、粗抽出液、培養菌体凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、またはそれらの菌体の破碎物を意味する。更にそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いられ得る。固定化は当業者に周知の方法である架橋法、共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法、包括法などで行い得る。酵素の固定化に使用される支持体としては、例えば、Duolite A568またはDS17186 (ローム・アンド・ハース社：登録商標) などのフェノールホルムアルデヒド陰イオン交換樹脂、Amberlite IRA935、IRA945、IRA901 (

ローム・アンド・ハース社：登録商標）、Lewatit OC1037（バイエル社：登録商標）、Diaion EX-05（三菱化学：登録商標）などのポリスチレン樹脂のような各種アミンやアンモニウム塩あるいはジエタノールアミン型の官能基を持つ各種の陰イオン交換樹脂が適している。その他、DEAE-セルロースなどの支持体も使用することができる。

【0042】

固定化酵素の好適な製造方法としては、例えば、WO96/20275に示す方法で行い得る。すなわち、ヒダントイナーゼ活性を有する菌株の培養液を集菌、超音波などにより菌体を破碎後、得られた酵素液に例えば陰イオン交換樹脂Dulcite A-568を加えて攪拌して酵素を吸着させることができる。この酵素を吸着した樹脂に例えばグルタルアルデヒドなどの架橋試薬を加えて攪拌することで架橋処理を行い、さらに安定性を向上させることもできる。これらの処理を行った後に樹脂を濾集、洗浄して固定化ヒダントイナーゼを得ることができる。

【0043】

ヒダントイナーゼを効率良く高生産する高活性菌を得るためには、周知のとおり、形質転換微生物を作成することが有効である。作成方法としては、例えばWO96/20275記載のように、ヒダントイナーゼ活性を示す菌株からヒダントイナーゼ遺伝子をクローニングした後、適当なベクターとの組換えプラスミドを作成して、これを用いて適当な宿主菌を形質転換することで得られる。なお、組換えDNA技術については当該分野において周知であり、例えば、Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) に記載されている。

【0044】

このようにして得られた、ヒダントイナーゼを高生産する形質転換微生物としてはWO96/20275記載の、バチルス・スピーシーズ (Bacillus

sp.) KNK245 (FERM BP-4863) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含むエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pTH104 (FERM BP-4864)、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含むエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pAH1043 (FERM BP-4865)、又はシュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.) KNK003A (FERM BP-3181) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含むエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pPHD301 (FERM BP-4866) を挙げる事ができる。

【0045】

これら形質転換体によるヒダントイナーゼの生産、あるいは、前述のヒダントイナーゼ活性を示す菌株によるヒダントイナーゼの生産は、例えば、WO96/20275記載の、通常の栄養培地を用いて培養を行えば良く、必用に応じて、酵素誘導のための処理を行うこともできる。

【0046】

本発明の酵素反応は以下の方法で行うことができる。基質としては前記式(1)で表されるラセミ体の5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを用いてヒダントイナーゼ存在下、水性媒体中で反応を行う。

【0047】

基質の仕込み濃度は0.1%以上、90%(w/v)以下で溶解または懸濁した状態で反応を行い、反応温度は10℃以上、80℃以下の適当な温度で調節し、pH4以上、10以下に保ちつつ暫時静置または攪拌すればよい。また、基質を連続的に添加する。反応は、バッチ法または連続方式で行い得る。

【0048】

本発明の反応は、固定化酵素、膜リアクターなどを利用して行うことも可能である。ヒダントイナーゼとしては、前述のごとく酵素自体、或いは、本酵素活性を有する微生物若しくはその処理物等、及び本酵素活性を有する形質転換微生物

或いはその処理物で用いられ得る。水性媒体としては、水、緩衝液、これらにエタノールのような水溶性有機溶媒を含む水性媒体、あるいは、水に溶解しにくい有機溶媒、たとえば、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、*n*-ヘキサンなどの有機溶媒を含む水性媒体との2層系などの適当な溶媒を用いることができる。さらに必用に応じて、抗酸化剤、界面活性剤、補酵素、金属などを添加することもできる。

以上のようにして得られたL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインは、特に精製せずにそのまま次工程に用いることができるが、光学純度、化学純度向上のためには晶析にて精製することが好ましい。

【0049】

晶析に用いる溶媒としては、例えば、酢酸エチル、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等が挙げられる。これらは、単独で使用しても2種以上の混合溶媒として用いてもよい。なかでも酢酸エチル、又はエタノールが好ましい。また、晶析においては、収率向上の観点から貧溶媒を併用してもよく、貧溶媒の例としてはベンゼン、トルエン、ヘキサン、ヘプタン、シクロヘキサンが挙げられ、好ましくはヘキサン、ヘプタンである。

【0050】

次に、前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを硫黄化剤と反応させて前記式(3)で表されるL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを製造する方法について説明する。

【0051】

前記式(3)において、 R^1 は水素原子、 $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有してもよいベンジル基、又は $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表わす。

【0052】

$C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*

ーブチル基, t-ーブチル基, ペンチル基, ヘキシル基, シクロプロピル基, シクロブチル基, シクロペンチル基, シクロヘキシル基などが挙げられるが、脱保護の容易さから t-ーブチル基が好ましい。

【0053】

置換基を有してもよいベンジル基としては、ベンジル基, o-またはp-メトキシベンジル基, o-またはp-ヒドロキシベンジル基, o-またはp-アセトキシベンジル基, p-ニトロベンジル基, 2, 4, 6-トリメチルベンジル基, 2, 4, 6-トリメトキシベンジル基が挙げられるが、脱保護の容易さからベンジル基またはp-メトキシベンジル基が好ましい。

【0054】

C₁~C₂₀のアルカノイル基としてはアセチル基, プロパノイル基, ブタノイル基, ペンタノイル基, ヘキサノイル基などが挙げられるが、導入, 脱保護の容易さからアセチル基が好ましい。

【0055】

C₁~C₂₀アルコキシカルボニル基としては一般的にSの保護基として用いられるものであれば特に制限されるものではないが、ベンジロキシカルボニル基, t-ーブチロキシカルボニル基が好ましい。R², R³はそれぞれ独立に水素原子もしくはC₁~C₂₀のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異なっているもよい。

【0056】

C₁~C₂₀のアルカノイル基としてはアセチル基, プロパノイル基, ブタノイル基, ペンタノイル基, ヘキサノイル基などが挙げられるが、導入, 脱保護の容易さからアセチル基が好ましい。

【0057】

本反応で用いる硫黄化剤としては、例えば水硫化ナトリウム、水硫化カリウム、水硫化カルシウム、水硫化バリウム、水硫化マグネシウム、水硫化リチウム、水硫化ルビジウム等のアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水硫化物；水硫化アンモニウム；t-ーブチルメルカプタン等のアルキルメルカプタン；ベンジルメルカプタン、p-メトキシベンジルメルカプタン等のアラルキルメルカプタン

; チオ酢酸カリウム、チオ酢酸等のチオアシル化合物等が挙げられる。

【0058】

工業的に安価で入手が容易であることや取り扱いの簡便さおよび反応収率が良好で硫黄原子の脱保護操作が不要であることなどの点から、水硫化ナトリウムまたは水硫化カリウムが望ましい。なお、チオ酢酸やチオ酢酸カリウム等のチオカルボン酸又はその塩を硫黄化剤として用いた場合、窒素上にアシル基が導入されることがある。

【0059】

本反応は塩基の共存下に行うことが好ましく、塩基としては例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム等が挙げられる。

【0060】

反応溶媒としては、使用する硫黄化剤にもより特に限定されるものではないが、例えば水硫化ナトリウムまたは水硫化カリウム等を用いる場合、水またはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*t*-ブチルアルコール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、ジメチルスルホキシド、ジエチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等の非プロトン性極性溶媒の群より選ばれる溶媒を単独あるいは混合して用いることが好ましい。

【0061】

得られたL-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(3)は、特に精製操作を行わずに次工程に使用しても良いし、化学純度向上、光学純度向上のために晶析等により精製してもよい。

【0062】

次に、L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(3)の加水分解について説明する。ヒダントイン部分の加水分解は酸もしくはアルカリ性水溶液のどちらでも可能であるが、ヒダントイン(3)におけるR¹と加水分解条件によって、加水分解後にL- α -メチルシステインもしくはその塩が得られる場合と、更に硫黄原子の脱保護が必要となる場合がある。例えば、R¹が*t*-ブチル基の場合、アルカリ性水溶液では、更なる硫黄原子の脱保護が必要となるが、塩酸による加水分解では硫黄原子の脱*t*-ブチル化反応が同時に進行しL- α -メチルシ

ステイン塩酸塩が得られることがわかった。また R^1 がアセチル基の場合には、酸でもアルカリでも硫黄原子の脱アセチル化が同時に進行し、L- α -メチルシステインまたはその塩が得られる。さらに R^1 がベンジル基の場合、加水分解後ナトリウム等を用いた脱保護が必要となる。酸加水分解を行う場合、酸としては特に限定されないが、例えば塩酸、硫酸、硝酸、臭化水素酸、酢酸等が挙げられ、これらを単独または混酸として用いることが好ましい。アルカリ加水分解を行う場合、アルカリの例としては水酸化ナトリウム、水酸化バリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等が挙げられ、反応収率の面から水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム、水酸化カルシウム、水酸化リチウムが特に好ましい。

【0063】

加水分解の反応温度については好ましくは70°Cから180°Cであり、用いた溶媒の沸点以上で反応を行う場合には耐圧反応器を用い封管中で行うことが好ましい。反応温度があまり低いと反応時間が非常に長くなり数日を要するだけでなく、ジスルフィド体が副生する傾向にあり、高すぎると他の副反応も懸念されるため、加水分解は90°Cから150°Cの範囲で行うことがより好ましい。

【0064】

L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインへの硫黄化および加水分解は、アルカリ水溶液中、ワンポットで行うことも可能である。用いるアルカリ水溶液としては例えば、水酸化ナトリウム、水酸化バリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化セシウムなどが挙げられるが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウムが好ましい。この場合の硫黄化剤としては、特に限定されるものではないが、例えばベンジルメルカプタン、p-メトキシベンジルメルカプタン、n-ブチルメルカプタン、sec-ブチルメルカプタン、プロピルメルカプタンなどが挙げられるが、ベンジルメルカプタンあるいはt-ブチルメルカプタンが好ましい。反応温度は硫黄化反応は0°Cから100°Cが好ましく、特には20°Cから80°Cが好ましい。続く加水分解は前記と同じく好ましくは70°Cから180°Cであり、更に好ましくは90°Cから150°Cである。

【0065】

ヒダントイン (3) の加水分解により L- α -メチルシステインまたはその塩を製造する場合、ジスルフィド体が副生することがあるが、その場合副生したジスルフィド体は還元剤にて、L- α -メチルシステインまたはその塩に戻すことができる。還元剤としては、ジスルフィド結合を切断し得るものであれば特に限定されるものではないが、例えば亜鉛、錫、マグネシウムなどの金属あるいはホスフィン化合物が挙げられる。中でも優れた切断能を有し、しかも抽出操作での除去が容易なトリアリールホスフィン又はトリアルキルホスフィン化合物が好ましく、トリフェニルホスフィンが取り扱いの容易さ、価格の面から特に好ましい。

【0066】

【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0067】

(参考例1) 5-メチル-5-クロロメチルヒダントインの製造法

炭酸アンモニウム (753 g, 6.6 mol), シアン化ナトリウム (135 g, 2.75 mol) を室温で蒸留水 (730 mL) に溶かしエタノール (730 mL) を加えた。さらにクロロアセトン (204 g, 2.2 mol) を加え10分間攪拌した後、60°Cまで加熱しそのまま一晩攪拌した。反応液を室温まで放冷後、約半分の液量まで減圧下溶媒を留去した。30 wt %水酸化ナトリウム水溶液約400 gを加えpHを12に調整し、トルエンで洗浄した (1.5 L \times 2)。氷冷下、濃塩酸700 gを加えpHを7とし、酢酸エチルにて抽出した (2 L \times 2)。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した後に減圧下濃縮し、白色固体198.5 gを得た。HPLC分析 (カラム: COSMOS IL 5C8 (ナカライ社製), 移動相: アセトニトリル/10 mMリン酸二水素カリウム水溶液=30/70, 流速: 0.8 ml/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 40°C) の結果、この白色固体は上記表題化合物を192.5 g (1.2 mol) を含有していた (収率54%)。この白色固体は精製する

ことなく次の工程に使用した。

^1H NMR (300MHz, D_2O) δ : 3.86 (d, 1H), 3.75 (d, 1H), 1.51 (s, 3H)。

【0068】

(実施例1) L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

WO96/20275記載の培養方法と固定化酵素の調製方法に従い、バチルス sp. KNK245株 (FERM BP-4863) を培養、集菌後、超音波破碎して得た酵素液に固定化用担体である陰イオン交換樹脂、Duolite A-568を添加して酵素を吸着させ、さらにグルタルアルデヒドで架橋処理することで固定化ヒダントイナーゼを得た。

次に、参考例1で得たラセミ体の5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン粗結晶9.1g (83.6wt%) に水91mlと0.5M硫酸マンガン水溶液0.18mlを加え20wt%水酸化ナトリウム水溶液によりpH8.7に調整した溶液に、上記の様にして得られた固定化ヒダントイナーゼ32g (湿重量)を加えて、45℃、25時間攪拌して反応させた。反応中は20wt%水酸化ナトリウム水溶液によりpHを8.7に保った。反応終了後、固定化ヒダントイナーゼをろ別、洗浄して得られた濾液を6N塩酸によりpH7に調整した後、等量の酢酸エチルで二回抽出した。得られた酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウム80gを添加して乾燥させた後、減圧濃縮乾固して3.35gの5-クロロメチル-5-メチルヒダントインを取得した。これをHPLC分析 (カラム: CHIROBIOTIC T (アドバンスド・セパレーション・テクノロジーズ・インク社製) 2本連結, 移動相: 水/エチルアルコール=9/1, 流速: 0.3ml/min, 検出波長: 210nm, カラム温度: 40℃) した結果、化学純度は91.8wt%、光学純度は97.0% ee、ヒダントイン収率は40.5%であった。また、得られた光学活性ヒダントインがL体であることを、実施例8から24に示す方法でメチルシステインに誘導して旋光度を測定することで確認した。

【0069】

(実施例2) L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

アグロバクテリウム sp. KNK712株 (FERM BP-1900)

を固体培地 (10 g/l ポリペプトン、10 g/l 肉エキス、5 g/l イーストエキス、15 g/l、pH 7.5) で30℃、48時間培養した。この菌体一白金耳を、500 ml 容坂口フラスコに入れ120℃で15分間殺菌した50 ml の液体培地 (10 g/l ポリペプトン、10 g/l 肉エキス、5 g/l イーストエキス、pH 7.5) に植菌して30℃、24時間振とう培養した。次に、この培養液1 ml を、上記液体培地に1 g/l ウラシル、20 mg/l 塩化マンガンを加えた液体培地に植菌し、30℃にて24時間振とう培養した。この培養液15 ml から遠心分離により得られた菌体を1.5 ml の0.1 M炭酸緩衝液 (pH 8.7) に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン45 mgと0.1 M硫酸マンガン水溶液0.015 ml を添加し、10 N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを8.7付近に保ち、40℃で26時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析 (カラム: COSMOSIL 5C8-MS (ナカライ社製)、移動相: アセトニトリル/10 mMリン酸二水素カリウム水溶液=5/95、流速: 0.8 ml/min、検出波長: 210 nm、カラム温度: 40℃) した結果、ヒダントインの残存率は39%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析 (実施例1記載の分析条件) したところ92.7% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

【0070】

(実施例3) シュードモナス属細菌を用いたL-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IFO12996を固体培地 (10 g/l ポリペプトン、2 g/l イーストエキス、1 g/l 硫酸マグネシウム七水和物、15 g/l 寒天、pH 7.0) で30℃にて24時間培養した。この菌体一白金耳を、500 ml 容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100 ml 液体培地 (20 g/l 肉エキス、6 g/l グリセロール、1 g/l ウラシル、2 g/l リン酸二水素カリウム、1 g/l 硫酸マグネシウム七水和物、40 mg/l 塩化カルシウム二水和物、20 mg/l 硫酸第一鉄七水和物、20 mg/l 硫酸マンガン四～六水和

物、20 mg/l 硫酸銅五水和物、pH 5.5) に植菌し、30℃にて24時間振とう培養した。この培養液15 ml から遠心分離により得られた菌体を1.5 ml の0.1 M炭酸緩衝液 (pH 8.7) に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン15 mg と0.5 M硫酸マンガン水溶液0.003 ml を添加後、10 N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを9.0付近に保ちつつ、40℃で52時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析 (実施例2記載の分析条件) した結果、ヒダントインの残存率は70%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析 (実施例1記載の分析条件) したところ26.7% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

【0071】

(実施例4) バチルス属細菌を用いたL-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

バチルス sp. KNK245株 (FERM BP-4863) の乾燥保存菌体を、500 ml容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100 ml液体培地 (10 g/l ポリペプトン、10 g/l 肉エキス、5 g/l イーストエキス、pH 7.5) に植菌し、45℃にて15時間振とう培養した。この培養液2 ml を、上記培地成分に更に1 g/l ウラシル、20 mg/l 塩化マンガンを加えた培地に植菌し、45℃にて24時間振とう培養した。この培養液15 ml から遠心分離により得られた菌体を1.5 ml の0.1 M炭酸緩衝液 (pH 8.7) に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン15 mg と0.5 M硫酸マンガン水溶液0.003 ml を添加後、10 N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを9.0付近に保ちつつ、40℃で52時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析 (実施例2記載の分析条件) した結果、ヒダントインの残存率は74%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析 (実施例1記載の分析条件) したところ30.7% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

【0072】

(実施例5) リゾビウム属細菌を用いたL-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

リゾビウム sp. KNK1415株 (FERM BP-4419) の乾燥保存菌体を、500ml容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100ml液体培地 (10g/l ポリペプトン、10g/l 肉エキス、5g/l イーストエキス、pH7.5) に植菌し、30℃にて18時間振とう培養した。この培養液1mlを、上記培地成分に更に1g/l ウラシル、20mg/l 塩化マンガンを加えた培地に植菌し、30℃にて24時間振とう培養した。この培養液15mlから遠心分離により得られた菌体を1.5mlの0.1M炭酸緩衝液 (pH8.7) に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン15mgと0.5M硫酸マンガン水溶液0.003mlを添加後、10N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを9.0付近に保ちつつ、40℃で32時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析 (実施例2記載の分析条件) した結果、ヒダントインの残存率は54%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析 (カラム: CHIROBIOTIC T (アドバンスド・セパレーション・テクノロジーズ・インク社製、2本連結)、移動相: 0.036Mリン酸二水素カリウム/リン酸水溶液 pH2.2、流速: 0.5ml/min、検出波長: 210nm、カラム温度: 40℃) したところ22.5% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

【0073】

(実施例6) シュードモナス sp. KNK003A株 (FERM BP-3181) を用いたL-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

シュードモナス sp. KNK003A株 (FERM BP-3181) の乾燥保存菌体を、500ml容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100ml液体培地 (10g/l グリセリン、5g/l グルコース、0.3g/l イーストエキス、3.5g/l リン酸二水素カリウム、3.5g/l リン酸水素二ナトリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、0.02g/l 塩化マンガン四水和物、0.01g/l 硫酸鉄七水和物、1g/l

炭酸カルシウム、3 g/l N-カルバモイル-D-アラニン、pH 7.0、ただしグルコースとN-カルバモイル-D-アラニンは他の成分を加熱殺菌後、ろ過滅菌して添加)に植菌し、45℃にて46時間振とう培養した。この培養液40 mlから遠心分離により得られた菌体を1.5 mlの0.1 M炭酸緩衝液(pH 8.7)に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン15 mgと0.5 M硫酸マンガン水溶液0.003 mlを添加後、10 N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを9.0付近に保ちつつ、45℃で24時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析(実施例2記載の分析条件)した結果、ヒダントインの残存率は54%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析(実施例5記載の分析条件)したところ65.8% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

【0074】

(実施例7) L-5-メチル-5-クロロメチルヒダントインの精製法

実施例1のようにして得られた未精製L-5-メチル-5-クロロメチルヒダントイン(68.85 g)をエチルアルコール(137.7 mL)に溶かした後、60℃に加熱した。ヘキサンを内温が60℃より低くならないように注意しながら、白色の濁りが消えなくなるまでゆっくりと適下した(ヘキサン使用量: 105 mL)後、-20℃まで徐々に冷却しそのまま-20℃で一晩攪拌した。析出した白色結晶をろ別、メチルアルコールの5 wt%ヘキサン溶液(250 g)にて洗浄することにより、表題化合物を化学純度94.6%、光学純度98.3% eeで得た(晶析回収率94.7%) (参考例1記載の分析条件にて分析)。

【0075】

(実施例8) L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントインの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン(15.0 g, 化学純度87 wt%, 光学純度98.3% ee, 80 mmol), 水硫化ナトリウム(60 g, 純度70 wt%)を蒸留水150 gに溶解させ、窒素雰囲気下、1.5時間還流させた。室温まで放冷後、氷冷下、濃塩酸でpH=1とし、酢酸エチルにて抽

出した (500 mL × 4)。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後に減圧下で濃縮し、白色固体 14.8 g を得た。HPLC 分析 (カラム: COSMOSIL C18-AR (ナカライ社製), 移動相: リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液 (pH 2.0) / アセトニトリル = 97/3, 流速: 1.0 mL/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 30℃) の結果、この白色固体は上記表題化合物を 11.1 g (64.5 mmol) を含有していた (化学純度 75.0%, 収率 80.7%)。

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ: 3.52 (d, 1H), 3.32 (d, 1H), 1.40 (s, 3H)。

【0076】

(実施例 9) L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントインの精製法

L-5-メルカプトメチル-5-クロロメチルヒダントイン (2.04 g, 化学純度 83.6%, 光学純度 96.1% ee) を酢酸エチル (40 mL) に 60℃ で溶かし、ヘキサンを白色の濁りが消えなくなるまでゆっくりと適下した (ヘキサン使用量: 90 mL)。0℃ まで徐々に冷却しそのまま 0℃ で 1 時間攪拌した。析出した白色結晶をろ別、ヘキサン (50 mL) にて洗浄することにより、表題化合物を晶析回収率 92.4%, 化学純度 91.3%, 光学純度 98.6% ee で得た (化学純度は実施例 8 記載の分析条件にて分析。光学純度分析条件; カラム: CHIRALPAK AS (ダイセル社製), 移動相: イソプロパノール/ヘキサン = 3/7, 流速: 0.5 mL/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 30℃)。

【0077】

(実施例 10) L-5-メチル-5-tert-ブチルチオメチルヒダントインの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン (10.00 g, 61.51 mmol) を 10 wt % 水酸化ナトリウム水溶液 100 g に溶解させた後、tert-ブチルメルカプタン (10.4 mL, 92.27 mmol) を加え、窒素下、50℃ で 3 時間攪拌した。室温まで放冷後、反応液をトルエンで洗浄した (100 mL × 3)。濃塩酸を加え反応混合物の pH を 1~2 に調整し、生成する白色

固体をろ過にて分離し、水で洗浄した (100 mL×3) 後、減圧下乾燥し、表題化合物を白色固体として得た (7.79 g, 収率 58.6%) (参考例 1 記載の分析条件にて分析)。

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 2.89 (s, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.31 (s, 9H)。

【0078】

(実施例 11) L-5-メチル-5-ベンジルチオメチルヒダントインの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン (10 g, 61.5 mmol) を 10 wt % 水酸化ナトリウム水溶液 100 g に溶解させた後、ベンジルメルカプタン (11.5 mL, 98.4 mmol) を加え、窒素下、50°C で 3 時間攪拌した。室温まで放冷後、反応液をトルエンで洗浄した (20 mL×2)。濃塩酸を加え反応混合物の pH を 2.0 に調整し、生成する白色固体をろ過にて分離し、水で洗浄した後、減圧下乾燥し、表題化合物を白色固体として得た (14.82 g, 収率 96.3%) (参考例 1 記載の分析条件にて分析)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (s, 1H), 7.34-7.26 (m, 5H), 6.06 (s, 1H), 3.76 (d, 1H), 3.72 (d, 1H), 2.79 (d, 1H), 2.72 (d, 1H), 1.45 (s, 3H)。

【0079】

(実施例 12) L-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-メチルヒダントインの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン (5.88 g, 34.22 mmol, 化学純度 94.6%, 光学純度 98.3% ee) を窒素雰囲気下、ジメチルスルホキシド (137 g) に溶解し、チオ酢酸カリウム (14.05 g, 123.0 mmol) を加え 70°C で 21 時間反応させた。室温まで放冷後、10% 塩酸水溶液にて pH = 6~7 に調整し、酢酸エチルで抽出した。得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、酢酸エチルを減圧下留去することにより、オレンジ色の固体 12.45 g を得た。HPLC 分析 (参考例 1 記載の分析条

件にて分析)の結果、このオレンジ色固体は上記表題化合物を 5.48 g (22.43 mmol, 化学純度 44%) を含有していた (収率 65.5%)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 3.92 (d, 1H), 3.48 (d, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 1.80 (s, 3H)。

【0080】

(実施例 13) L-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-メチルヒダントインの精製法

上記実施例で得られた L-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-クロロメチルヒダントイン (5.48 g) を酢酸エチル (22 g) に溶かし、60°C に加熱した。ヘキサンを白色の濁りが消えなくなるまでゆっくりと適下し (ヘキサン使用量: 39.2 g)、室温まで放冷後、そのまま 20 時間攪拌、続いて -20°C まで徐々に冷却し -20°C で 6 時間攪拌した。析出した白色結晶をろ別、酢酸エチルの 1% ヘキサン溶液 (39.2 g) にて洗浄することにより、表題化合物を晶析回収率 78.3%, 化学純度 87.1%, 光学純度 99.1% ee で得た (化学純度は参考例 1 記載の分析条件にて分析。光学純度は HPLC 分析 (カラム: CHIRALCEL OD-H (ダイセル社製), 移動相: ヘキサン/イソプロパノール = 9/1, 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 30°C) にて決定)。

【0081】

(実施例 14) L-2-ベンジルチオメチルアラニンの製造法

L-5-ベンジルチオメチル-5-メチルヒダントイン (5.0 g, 20 mmol) を 2 規定水酸化ナトリウム水溶液 (40 g) に溶解し、100°C で 2 日間、攪拌した。室温まで放冷後、濃塩酸で pH = 7 に調整し析出した白色結晶をろ別、水で数回洗浄した。減圧下、乾燥させた後、得られた白色結晶を ^1H NMR, HPLC にて分析 (参考例 1 記載の分析条件にて分析) し、上記目的物であることを確認した (収率 78%)。

^1H NMR (300 MHz, $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$) δ : 7.28-7.08 (m, 5H), 3.71 (s, 2H), 2.88 (d, 1H), 2.72 (d, 1

H), 1.31 (s, 3H)。

【0082】

(実施例15) L-2-tert-ブチルチオメチルアラニンの製造法

L-5-tert-ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (1.00g, 4.62mmol) を 10wt%水酸化ナトリウム水溶液 (14.97g) に溶解し、110°Cで3日間、攪拌した。室温まで放冷後、4M塩酸でpH=6.5に調整し析出した白沈をろ別した。ろ液を濃縮し、生成した白色結晶をろ別後、水で数回洗浄した。減圧下、乾燥させた後、得られた白色結晶を¹H NMR, HPLCにて分析(参考例1記載の分析条件にて分析)し、上記目的物であることを確認した(収率78.8%)。

¹H NMR (300MHz, NaOD/D₂O) δ: 2.65 (d, 1H), 2.63 (d, 1H), 1.25 (s, 12H)。

【0083】

(実施例16) L-2-ベンジルチオメチルアラニンの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン (200mg, 1.23mmol) を 10wt%水酸化ナトリウム水溶液 2.0g に溶解させた後、ベンジメルカプタン (0.23mL, 2.0mmol) を加え、窒素下、50°Cで5時間攪拌した。反応温度を100°Cに上げ、さらに26時間攪拌した。30wt%水酸化ナトリウム水溶液を1.0g加えさらに24時間100°Cで攪拌し、HPLC分析したところ、表題化合物が生成していることを確認した(収率78.0%)。

【0084】

(実施例17) L-2-tert-ブチルチオメチルアラニンの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン (501.8mg, 3.08mmol) を 10wt%水酸化ナトリウム水溶液 5.03g に溶解させた後、tert-ブチルメルカプタン (0.55mL, 4.87mmol) を加え、窒素下、50°Cで5.5時間攪拌した。反応温度を100°Cに上げ、21時間攪拌した後、さらに10wt%水酸化ナトリウム水溶液 (5.00g) を添加し、2日間攪拌した。反応後に室温まで放冷、4M塩酸水溶液でpH=6.5に調整し析出し

た白沈をろ別した。ろ液を濃縮し、生成した白色結晶をろ別後、水で数回洗浄した。減圧下、乾燥させた後、得られた白色結晶を ^1H NMR, HPLCにて分析（参考例1記載の分析条件にて分析）し、上記目的物であることを確認した（収率53.1%）。

【0085】

（実施例18）L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L- β -ベンジルチオメチルアラニン（1g, 4.44mmol）を窒素下、液体アンモニア（50mL）に溶解し-78°Cで金属ナトリウムを少しずつ加えた。溶液が青色を呈したら反応溶液が還流するまで温度を上げ、青色が消えるようであればさらに金属ナトリウムを追加しながら30分攪拌した。塩化アンモニウムを青色が消え反応溶液が白色となるまで加え、温度を上げて液体アンモニアを気化させることにより除去した。2N塩酸水溶液でpH=1~2となるように調整し、水分を減圧下留去、得られた白色固体をさらに減圧下で一晩乾燥させた。白色固体にTHF（13mL）、エチルアルコール（6.5mL）を加えてスラリー化し約10分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、得られた白色固体をさらに減圧下で数時間乾燥させた。エチルアルコール、トルエンより晶析を行い、得られた白色結晶（473mg）を ^1H NMR, HPLC（カラム：CAPCELL PAK SCX（資生堂社製）、移動相：リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液（pH2.0）／アセトニトリル=95／5、流速：0.3ml/min、検出波長：210nm、カラム温度：30°C）で分析したところ、上記目的物であることがわかった（収率62.6%）。また旋光度を測定したところ、 $[\alpha]_{\text{D}20}=8.77$ （c1.15, H_2O ）であり、符号が文献値（Tetrahedron, 1993, 49, 2131~2138, WO98/38177）と一致することから立体が目的とするL体であることを確認した。

^1H NMR（300MHz, D_2O ） δ : 3.18（d, 1H）, 2.89（d, 1H）, 1.6（s, 3H）。

【0086】

（実施例19）L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L- β -トープチルチオメチルアラニン (433.9 mg, 2.27 mmol) を濃塩酸 (9 mL) に溶解し、窒素下、4 時間還流させた。室温まで放冷後、水分を減圧下留去、得られた白色固体をさらに真空ポンプで減圧乾燥した。白色固体に THF (6 mL), エチルアルコール (2 mL) を加えてスラリー化し約 10 分間攪拌し不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、得られた白色固体をさらに減圧下で数時間乾燥させた。エチルアルコール, トルエンより晶析を行い、得られた白色結晶 (229 mg) を ^1H NMR, HPLC (実施例 18 記載の分析条件) で分析したところ、上記目的物の塩酸塩であることがわかった (収率 58.7%)。

【0087】

(実施例 20) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントイン (1.0 g, 純度 89.2 wt%, 光学純度 98.6% ee, 5.57 mmol) を濃塩酸 (20 g) に溶解し、窒素下、60 時間還流させた。室温まで放冷後、塩酸水溶液を減圧下留去し、THF (50 mL), 1N 塩酸水溶液 (5 mL) およびトリフェニルホスフィン (2.73 g) を加え、窒素雰囲気下、50°C で 2 時間反応させた。室温まで放冷後、全体の容量が約 1/5 となるまで濃縮し、酢酸エチル (50 mL x 3) にて洗浄しトリフェニルホスフィン, トリフェニルホスフィンオキシド, 未反応ヒダントインおよびその他の不純物を除去した。水相を減圧下濃縮、得られた白色固体をさらに減圧下、一晚乾燥させた。白色固体に THF (15.6 mL), エチルアルコール (7.8 mL) を加えてスラリー化し約 10 分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、表題化合物を白色固体として得た (879 mg) ^1H NMR, HPLC (実施例 18 記載の分析条件) で分析したところ、上記目的物であることがわかった (収率 92.3%)。

【0088】

(実施例 21) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントイン (500 mg, 純度 89.2 wt%, 光学純度 98.6% ee, 2.78 mmol) を 30 wt% 水酸化ナトリウム水溶液 (5 g) に溶解し、窒素下、36 時間還流させた。室温まで放

冷後、濃塩酸にて $pH=1$ に調整し水分を減圧下留去した。THF (30 mL), 1 N 塩酸水溶液 (3 mL) およびトリフェニルホスフィン (1.57 g) を加え、窒素雰囲気下、50°C で2時間反応させた。室温まで放冷後、全体の容量が約 1/5 となるまで濃縮し、酢酸エチル (50 mL x 3) にて洗浄しトリフェニルホスフィン, トリフェニルホスフィンオキシド, 未反応ヒダントインおよびその他の不純物を除去した。水相を減圧下濃縮、得られた白色固体をさらに減圧下、一晚乾燥させた。白色固体に THF (9.3 mL), エチルアルコール (4.7 mL) を加えてスラリー化し約 10 分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、表題化合物を白色固体として得た (348 mg) 1H NMR, HPLC (実施例 18 記載の分析条件) で分析したところ、上記目的物であることがわかった (化学純度 74.1%, 収率 48.0%)。

【0089】

(実施例 22) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (3.4 g, 13.9 mmol) を濃塩酸 (34 g) に溶解し、窒素下、20 時間還流させた。濃塩酸 (34 g) を加えさらに 30 時間反応させた。室温まで放冷後、塩酸水溶液を減圧下留去し、THF (50 mL), 1 N 塩酸水溶液 (5 mL) およびトリフェニルホスフィン (2.17 g) を加え、窒素雰囲気下、50°C で2時間反応させた。室温まで放冷後、全体の容量が約 1/5 となるまで濃縮し、酢酸エチルにて洗浄しトリフェニルホスフィン, トリフェニルホスフィンオキシド, 未反応ヒダントインおよびその他の不純物を除去した。水相を減圧下濃縮、得られた白色固体をさらに減圧下、一晚乾燥させた。白色固体に THF (18 mL), エチルアルコール (6 mL) を加えてスラリー化し約 10 分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、得られた白色固体をさらに減圧下で数時間乾燥させた。エチルアルコール, トルエンより晶析を行い、得られた白色結晶 (1.02 g) を 1H NMR, HPLC (実施例 18 記載の分析条件) で分析したところ、上記目的物であることがわかった (収率 43.0%)。

【0090】

(実施例 23) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5- α -ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (202.3 mg, 0.935 mmol) を濃塩酸 (4 mL) に溶解し、窒素下、110℃で26時間攪拌した。室温まで放冷後、水分を減圧下留去、得られた残渣を¹H-NMR, HPLC (実施例18記載の分析条件) で分析した結果、L- α -メチルシステイン収率42.5%、L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントイン収率53.7%であった。

【0091】

(実施例24) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5- α -ブチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (202.5 mg, 0.936 mmol) を濃塩酸 (4 mL) に溶解し、これを耐圧反応容器内に封管し、150℃で26時間攪拌した。室温まで放冷後、水分を減圧下留去、得られた残渣をHPLC (実施例18記載の分析条件) で分析した結果、L- α -メチルシステイン収率46.3%、L- α -メチルシステインのジスルフィド体収率53.7%であった。

【0092】

(参考例2) L- α -メチルシステイン塩酸塩の光学純度決定法

実施例18記載の方法で得られたL- α -メチルシステイン塩酸塩 (74.9 mg, 0.44 mmol) を水 (3 mL) に溶解させ、炭酸水素ナトリウム (197.7 mg) を添加し、エタノール3 mLを加えた。窒素置換後、クロロ炭酸ベンジルエステル (0.17 mL, 1.10 mmol) を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に濃塩酸を添加してpH=1.9とし、酢酸エチルで抽出後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。これをPTLC (ヘキサン/酢酸エチル=1/1に少量の酢酸を添加) で精製し¹H NMRにて分析したところ目的物 (106 mg, 収率60%) であることがわかった。これをHPLCにて分析 (カラム: CHIRALCEL OD-RH (ダイセル社製), 移動相: リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液 (pH 2.0) / アセトニトリル=6/4, 流速: 1.0 mL/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 30℃, 保持時間19.15分 (D), 22.92分 (L)) した結果、光学純度は98.6% eeであった。

^1H NMR (300MHz, D_2O) δ : 7.30-7.40 (m, 10H), 5.22 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 1.63 (s, 3H)。

【0093】

【発明の効果】

本発明により、医薬品中間体として有用な L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩を安価で入手容易な原料から簡便に製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ラセミ体の 5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの酵素による D 立体選択的加水分解を利用し、医薬品中間体として有用な L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩を安価で入手容易な原料から簡便に製造できる方法を提供する。

【解決手段】 ラセミ体の 5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの酵素による D 立体選択的加水分解を利用し、L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインとし、硫黄化剤との反応で L-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを合成しこれを加水分解することにより L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩を製造する。

【選択図】 なし。

特願 2 0 0 2 - 2 6 1 5 2 4

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 9 4 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号

氏 名

鐘淵化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.